

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-196288

(43)公開日 平成8年(1996)8月6日

(51)Int.Cl.⁶ 識別記号 庁内整理番号 F I 技術表示箇所
C 12 P 7/64 // C 12 N 1/20 A 8828-4B
(C 12 P 7/64
(C 12 R 1:01)
(C 12 N 1/20)

審査請求 未請求 請求項の数1 O.L. (全4頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平7-12726	(71)出願人 591001949 株式会社海洋バイオテクノロジー研究所 東京都文京区本郷1丁目28番10号
(22)出願日	平成7年(1995)1月30日	(72)発明者 加藤 美砂子 静岡県清水市袖師町1900番地 株式会社海洋バイオテクノロジー研究所清水研究所内 (72)発明者 西島 美由紀 静岡県清水市袖師町1900番地 株式会社海洋バイオテクノロジー研究所内清水研究所内 (74)代理人 弁理士 平木 祐輔 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 長鎖脂肪酸の製造法

(57)【要約】 (修正有)

【目的】 産業上利用性の高い長鎖脂肪酸の効率的な製造法の提供。

【構成】 フランシセラ スピーシーズWYSA-40-2 株を培養し、培養物より長鎖脂肪酸を採取する長鎖脂肪酸の製造方法。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 フランシセラ スピーシーズWYSA-40-2株を培養し、培養物より長鎖脂肪酸を採取することを特徴とする長鎖脂肪酸の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、フランシセラ属に属する微生物による長鎖脂肪酸の製造法に関する。本発明の方法により製造される長鎖脂肪酸のうち、特に炭素数が20以上のアラキシン酸、セトレイク酸、ベヘン酸、エルカ酸、リグノセリン酸、ネルボン酸、キシメン酸は、オレオケミカルズの原料として重要である。

【0002】

【従来の技術およびその問題点】 炭素数が20以上の長鎖脂肪酸を生産する細菌として、これまでにビブリオ属の細菌(Arch Microbiol. 1992, 157巻, 223-228)、ミコバクテリウム属の細菌(J. Biol. Chem. 1973, 248巻, 2303-2309)、フランシセラ属の細菌(J. Clinical Microbiol. 1989, 27巻, 1601-1608)などが知られている。しかし、これらの細菌が生産する脂質中の長鎖脂肪酸の含有率は極めて低い。また、炭素数20~24の脂肪酸は魚油から抽出されたものが産業上利用されているが、高純度に目的とする長鎖脂肪酸を得ることは困難である。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、長鎖脂肪酸を簡便にかつ効率的に生産する方法を提供することを目的とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者等は、微生物を用いて長鎖脂肪酸を効率的に生産する方法について鋭意検討を重ねた結果、フランシセラ属に属する一菌株が、極めて高い長鎖脂肪酸生産能を有することを見出し、本発明を完成した。即ち、本発明は、フランシセラ スピーシーズWYSA-40-2 株を培養し、培養物より長鎖脂肪酸を採取することを特徴とする長鎖脂肪酸の製造方法である。

【0005】 以下に本発明を詳細に説明する。本発明に用いる菌株としては、フランシセラsp. WYSA-40-2 株を挙げることができる。フランシセラsp. WYSA-40-2 株は、自然界から新たに単離した株であり、その細菌学的性質については以下の通りである。なお、形態観察は、培地にフランシセラsp. WYSA-40-2 株を植菌し、30℃で24~48時間培養したのちに光学顕微鏡および透過型電子顕微鏡を用いて行った。培地は、マリンアガ (Bacto Marine Agar 2216, Difco 社製) あるいはマリンプロス (Bacto Marine Broth 2216, Difco社製) を用いた。また、本菌株は培地中の塩化ナトリウム濃度が1%以下では菌の生育が認められないことから、生化学的性状の試験は75%人工海水を用いて培地を作製するかあるいは培地中に3%塩化ナトリウムを添加することによって行つ

50

た。

【0006】 a. 形態

- 1) 細胞の形および大きさ：球菌、0.4~0.8 μm
- 2) 細胞の多形性の有無：なし
- 3) 運動性の有無、鞭毛の着生状態：なし
- 4) 胞子の有無：なし
- 5) グラム染色性：陰性

【0007】 b. 各培地における生育状態

- 1) マリンアガー平板培養：良好に生育、コロニーは円形、凸円状、全縁、湿光、不透明乳白色
- 2) マリンアガー斜面培養：良好に生育、糸状、乳白色
- 3) マリンプロス培養：良好に生育、濁り、沈殿を生じる
- 4) マリンプロスゼラチン穿刺培養：液化する (30℃、1週間後、20℃、3週間後)
- 5) リトマスミルク：培地上部がややアルカリ化、凝固も消化もせず。

【0008】 c. 生理学的性質

- 1) 硝酸塩の還元：還元しない
- 2) MRテスト：-
- 3) VPテスト：+
- 4) インドールの生成：-
- 5) 硫化水素の生成：+w (ただし鉛糖紙を用いた)
- 6) でんぶんの加水分解：-
- 7) クエン酸の利用：Simmons 培地 利用しない : Cristensen培地 利用しない
- 8) 無機窒素源の利用：利用する
- 9) 色素の生成：なし
- 10) ウレアーゼ活性：陰性
- 11) オキシダーゼ活性：陰性
- 12) カタラーゼ活性：陽性
- 13) 生育の範囲 (温度、pH)：温度10~45℃、34℃でもっとも良好に発育。pH 3~11、最適生育pH範囲 6~8
- 14) 酸素に対する態度：好気性
- 15) OFテスト：酸化

【0009】 16) 糖類から酸およびガスの生成の有無
基礎培地は50%マリンプロスを使用 30℃ 3週間培養後

40

3

	酸の生成	ガスの生成
L-アラビノース	-	-
D-キシロース	-	-
D-グルコース	+	-
D-マンノース	+	-
D-フラクトース	+	-
D-ガラクトース	-	-
麦芽糖	-	-
ショ糖	-	-
乳糖	-	-
トレハロース	+	-
D-ソルビット	-	-
D-マンニット	-	-
イノシット	-	-
グリセリン	-	-
でんぶん	-	-

- : 生成しない + : 生成する

17) エスクリンの分解：陰性

18) アルギニンの分解：陰性

DNAの分解：分解する

ポリ-β-ヒドロキシ酪酸の蓄積：蓄積しない

19) 好塩性：1~10%

20) β-ガラクトシダーゼ：陰性

21) GC含有：32.8%

22) イソブレノイドキノン：ユビキノンQ-8

23) 脂肪酸組成(30°C)：モル%

10:0 (17.8%), 12:0 (2.5%), 14:0 (4.1%), 16:0 (5.0%), 18:0 (6.0%), 18:1 (13.1%), 20:0 (6.3%), 20:1 (1.8%), 22:0 (14.6%), 22:1 (3.4%), 24:0 (6.1%), 24:1 (19.1%)

【0010】以上の菌学的性質からバージーズ・マニュアル・オブ・データーミネイティブ・バクテリオロジー第8版の分類基準に従って公知の菌種と比較した。本菌株は好気性グラム陰性球菌で鞭毛を有せず、オキシダーゼ陰性、カタラーゼ陽性、O/F試験で好気的にブドウ糖から酸を产生する。これらの特徴からグラム陰性好気性球菌の属を検索したが、本株はDNAのGC含量が低いことからフランシセラ (*Francisella*)属に該当すると考えられた。

【0011】さらに、生育にナトリウム塩が必要であること、硫化水素の產生、菌体脂肪酸組成についてもフランシセラ属菌とほぼ一致したことから、本菌株をフランシセラ属と同定し、フランシセラ スピーシーズ (*Francisella* sp.)とした。そして、この菌株をフランシセラ スピーシーズ (*Francisella* sp.) WYSA-40-2とし、平成6年11月9日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-14621として寄託した。

【0012】本発明に用いる菌株としては、上記のフランシセラ スピーシーズ WYSA-40-2株だけでなく、この菌株の人工的変異方法、例えば紫外線照射、X線照射、

4

変異誘起剤処理などあるいは自然発生による変異株でも長鎖脂肪酸を生産するものであれば本発明に用いることができる。次に本発明の菌株の培養法について述べる。

【0013】本発明の培養に於ては、通常の細菌の培養方法を用いることができる。培地としては、資化可能な炭素源、窒素源、無機物および必要な生育、生産促進物質を適当量含む培地であれば、合成培地、天然培地いずれでも使用可能である。炭素源としてはグルコース、デンプン、デキストリン、マンノース、フラクトース、シュークロース、ラクトース、キシロース、アラビノース、マンニトール、糖蜜などを単独または組み合わせて用いられる。さらに、菌の資化能によっては塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、硝酸ナトリウム、尿素、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、乾燥酵母、コーンスチーブリカー、大豆粉、カザミノ酸などが単独または組み合わせて用いられる。そのほか必要に応じて食塩、塩化カリウム、硫酸マグネシウム、炭酸カルシウム、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウム、硫酸第一鉄、塩化カルシウム、硫酸マンガン、硫酸亜鉛、硫酸銅などの無機塩類を加える。さらに使用菌の生育や長鎖脂肪酸の生産を促進する微量成分を適当に添加することができる。

【0014】培養法としては、液体培養法が最も適している。培養温度は10°C~45°Cが適当であり、培養中の培地のpHは炭酸カルシウムなどの添加により、3~11、特に6~8に維持することが望ましい。液体培養で通常1~7日培養を行なうと、目的物質長鎖脂肪酸が菌体中に生成蓄積される。培養物中の生成量が最大に達したときに培養を停止する。培養物から長鎖脂肪酸の単離精製は、微生物代謝生産物をその培養物から単離精製するために常用される方法に従って行なわれる。たとえば、培養物を濾過により培養液と菌体にわけ、菌体をクロロホルム、メタノールなどで抽出する。以下に本発明の実施例を示す。

【0015】

【実施例】表1に示す組成のマリンプロス培地（ディフコ社製）100mlにフランシセラsp. WYSA-40-2株を接種し、20°Cで2日間、振盪培養後、遠心分離によって菌体を回収し、凍結乾燥した。

【0016】

【表1】

5

マリンプロス組成(1リットル)	
バクトベプトン	5 g
バクトイーストエキストラクト	1 g
クエン酸鉄	0.1 g
塩化ナトリウム	19.45 g
塩化マグネシウム	5.9 g
硫酸ナトリウム	3.24 g
塩化カルシウム	1.8 g
塩化カリウム	0.55 g
炭酸水素ナトリウム	0.16 g
臭化カリウム	0.08 g
塩化ストロンチウム	0.034 g
ホウ酸	0.022 g
ケイ酸ナトリウム	0.004 g
フッ化ナトリウム	0.0024 g
硝酸アンモニウム	0.0016 g
リン酸水素二ナトリウム	0.008 g

【0017】この乾燥菌体を粉碎してBligh & Dyer法(カナディアン・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー・アンド・フィジオロジー(Can J. Biochem. Physiol. 37, 11(1959))により抽出精製した後、溶媒を減圧留去し、1.3 mgの粗脂質を得た。培養温度を30°Cおよび37°Cに変え、全く同様の方法で培養し、抽出することによって脂質をそれぞれ1.2 mgおよび1.3 mg得ることができた。脂質は一部をメチルエステル化した後、ガスクロマトグラフィー(分析条件は下記の通りである)により脂肪酸組成の分析を行なった。その結果を表2に示す。また、比較のためフランシセラ・トラレンシス(*Francisella tularensis*)に属する公知菌株の脂肪酸組成を表3に示す(J.Clin. Microbiol. 27, (1989) 1601-1608)。なお、ガスクロマトグラフィーにより得られたピークは、マススペクトロメトリーにより同定を行なった。

【0018】ガスクロマトグラフィー分析条件
カラム : キャビラリーカラム DB 23 (J & W
社)
内径0.25 mm 長さ 30 cm

カラム初期温度: 150°C

カラム最終温度: 210°C

注入温度 : 270°C

検出器温度 : 300°C

(4)

6

検出器 : FID
キャリアーガス: ヘリウム
【0019】
【表2】

脂肪酸組成(重量%)

脂肪酸	20°C	30°C	37°C
10 : 0	12.1	10.9	13.2
12 : 0	1.5	1.8	2.6
14 : 0	2.6	3.3	5.7
16 : 0	5.1	4.4	5.0
18 : 0	5.9	5.9	6.4
18 : 1	13.1	12.7	9.5
20 : 0	5.7	6.7	5.6
20 : 1	4.2	1.9	0.9
22 : 0	15.1	17.0	15.6
22 : 1	6.8	3.9	1.9
24 : 0	3.4	7.7	11.8
24 : 1	24.4	23.8	21.8
	100.0	100.0	100.0

10 【0020】

20 【表3】

脂肪酸組成(重量%)

脂肪酸	<i>Francisella tularensis</i>
10 : 0	30
12 : 0	0
14 : 0	11
16 : 0	10
18 : 0	3
18 : 1	7
20 : 0	1
20 : 1	0
22 : 0	5
22 : 1	1
24 : 0	5
24 : 1	5
その他	22
	100

30 【0021】

【発明の効果】本発明は、産業上利用性の高い長鎖脂肪酸の効率的な製造法を提供する。

フロントページの続き

(51) Int.Cl. 6

識別記号 庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 12 R 1:01)

(72)発明者 佐野 浩

静岡県清水市袖師町1900番地 株式会社海
洋バイオテクノロジー研究所内清水研究所
内